

水生观赏植物组织培养研究进展

吴丽爽, 王晓萍

(哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150025)

摘要: 近年来, 水生观赏植物组织培养技术的研究已取得很大进展, 从水生观赏植物组织培养的情况、培养基成份、外植体的表面灭菌等方面对该领域研究进展进行综述。

关键词: 水生观赏植物; 组织培养

中图分类号: S682.32 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)05-0025-04

Tissue Culture of Aquatic Ornamental Plant

WU Li-shuang WANG Xiao-ping

(Harbin Normal University, Harbin 150025)

Abstract: In recent years, the research for tissue culture of aquatic ornamental plants had made remarkable progress. The overall survey, ingredient of culture medium and sterilization schemes for explants of tissue culture of aquatic ornamental plants were summarized in this article.

Key words: aquatic ornamental plant; tissue culture

植物组织培养是现代植物生物技术和农业生产上应用非常广泛的技术, 越来越受到人们的重视并发挥着显著的作用, 创造出很大的经济效益^[1]。水生观赏植物不仅具有较高的观赏价值, 其中不少种类还兼有食用、药用之功能, 在现代物质文明和精神文明的建设中, 它们发挥着积极的促进作用。我国水生观赏植物多采用传统的播种和常规无性繁殖方法进行生产, 缺点较多。为了进一步拓展国内外水生观赏植物市场, 可以利用组织培养技术来提高观赏植物的繁殖以及培育新品种, 以满足社会对水生观赏植物的需求, 提高人们的物质文化生活水平。

1 水生观赏植物组织培养研究概况

迄今为止, 国内外报道了 23 个科 43 个属将近 60 种水生观赏植物已成功地进行了组织培养(见表 1), 采用的外植体主要有茎尖、茎段、不定芽及叶片等。

2 培养基成份的研究

2.1 基本培养基

水生观赏植物大多数采用 MS 为基本培养基,

因培养目的不同在无机盐、激素、有机物用量上不同。如迷你宝塔(*Limnophila glabra*)、红柳(*Ammannia gracilis*)、小对叶(*Bacopa monnieri*)、大红叶(*Ludwigia perennis*)在进行芽诱导时采用 MS 培养基, 而进行根诱导时则采用 1/2MS 培养基, 在启动与增殖阶段的各种无机物及激素含量均高于生根阶段的含量^[2]; 用于红蛋(*Echinodorus osiris*)茎尖的培养基, 在启动、增殖和生根阶段, 其培养基的无机物、有机物、激素的种类及用量均不相同^[3]。

2.2 pH

植物组织培养 pH 为 5.0~6.0 较适宜, 高于 6.0 时, 培养基会变硬; 低于 5.0 时, 琼脂则不凝固。大多数水生观赏植物要求 pH 为 5.8, 但也有特殊情况, 如鹤顶兰(*Phaius tankervilleae*)要求 pH 为 5.1~5.4^[4]; 小圆叶(*Rotula rotundifolia*)和叶底红(*Ludwigia repens*)要求 pH 为 5.4^[5]; 绿椒(*Cryptocoryne crispatula* var. *balansae*)要求 pH 为 6.0^[6]。

2.3 碳源

大多数水生观赏植物用 3% 的蔗糖浓度效果最佳, 但有例外, 如水芹(*Oenanthe japonica*)添加了 2% 的蔗糖^[7]; 绿椒则是添加 2.5% 的蔗糖^[8]; 而荸荠(*Eleocharis tuberosa*)则是添加了 9% 的蔗糖^[8]。在水小榕(*Anubias barteri*)^[9]、轮叶狐尾藻(*Myriophyllum verticillatum*)^[10]和香蕉草(*Nymphoides aquatica*)^[11]的培养中则使用 2% 的白糖作为碳源。

收稿日期: 2008-02-25

基金项目: 黑龙江教育厅资助项目(10541088)

第一作者简介: 吴丽爽(1983-), 女, 黑龙江人, 硕士, 从事植物分子遗传学研究。E-mail: wulishuang2008@126.com。

通讯作者: 王晓萍, E-mail: dr_wxp@yahoo.com.cn。

表 1 水生观赏植物组织培养统计

序号	科	属	植物名称	生态类型	外植体
1	兰科	鹤顶兰属	鹤顶兰 <i>Phaius tankervilleae</i>	多年生挺水草本	幼根, 种子
		血叶兰属	血叶兰 <i>Ludisia discolor</i>	多年生沉水草本	茎段
2	泽泻科	慈菇属	慈菇 <i>Sagittaria trifolia</i> L.	多年生挺水草本	茎尖
			华夏慈菇 <i>Sagittaria trifolia</i> var. <i>sinensis</i>	多年生挺水草本	茎尖
		泽泻属	泽泻 <i>Alisma orientalis</i>	多年生挺水草本	茎尖
		刺果泽泻属	红蛋 <i>Echinodorus osiris</i>	多年生沉水草本	茎尖
			红玫瑰 <i>Echinodorus horemani</i>	多年生沉水草本	腋芽
		皇冠属	皇冠草 <i>Echinodorus orisis</i> L.	多年生沉水草本	叶片
		水芹属	水芹 <i>Oenanthe japonica</i> L.	多年生宿根草本	叶片
		芋属	芋 <i>Colocasia esculenta</i> L.	一年生水生草本	茎尖
			大野芋 <i>Colocasia gigantea</i>	多年生宿根草本	叶片
		海芋属	海芋 <i>Alocasia macrorrhiza</i> L.	多年生水生草本	不定芽
4	天南星科	榕叶属	小水榕 <i>Aubias barteri</i>	多年生沉水草本	茎尖
		辣椒草属	青椒 <i>Cryptocoryne crispatula</i> var. <i>balansae</i>	多年生沉水草本	茎段
		隐棒花属	金椒草 <i>Cryptocoryne costata</i>	多年生沉水草本	茎尖
		花叶芋属	红椒 <i>Cryptocoryne wendtii tropica</i>	多年生沉水草本	叶片
			彩叶芋 <i>Caladium bicolor</i>	多年生草本	嫩叶片
		花烛属	火鹤 <i>Araaceae anthurium</i>	多年生草本	茎尖
		荸荠属	荸荠 <i>Eleocharis tuberosa</i>	多年生挺水草本	茎尖
		报春花属	报春花 <i>Primula malacoides</i>	多年生挺水草本	叶片
					原生质体
7	三百草科	三百草属	三百草 <i>Saururus chinensis</i> L.	多年生挺水草本	叶片
8	百合科	龙血树属	金边富贵竹 <i>Dracaena sandersoniana</i>	多年水生灌木	茎段
		萱草属	黄花菜 <i>Heimerocallis fulva</i> L.	多年生草本植物	茎段
9	睡莲科	莲属	荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	多年生挺水草本	茎尖
			莲藕 <i>Nelumbo nucifera</i>	多年生挺水草本	茎尖, 顶芽
10	唇形科	薄荷属	野薄荷 <i>Mentha haplocalyx</i> Briq	多年生宿根草本	茎段
11	苋科	虾钳菜属	宽叶血心兰 <i>Alternanthera reineckii</i>	多年生沉水草本	茎节
		莲子草属	水花生 <i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart.)	多年生宿根草本	茎段
12	爵床科	水蓼属	红柳 <i>Ammannia gracilis</i>	多年生沉水草本	茎尖
			大青叶 <i>Heteranthera zosterifolia</i>	多年生沉水草本	嫩茎
13	玄参科	假马齿苋属	小对叶 <i>Bacopa monnieri</i>	多年生沉水草本	茎尖
		石龙尾属	迷你宝塔 <i>Limnophila glabra</i>	多年生沉水草本	茎尖
			大宝塔草 <i>Limnophila aquatica</i>	多年生沉水草本	茎段
		母草属	陌上菜 <i>Lindernia procumbens</i> (Krock.) Philcox.	多年生沉水草本	嫩茎
14	小二仙草科	狐尾藻属	轮叶狐尾藻 <i>Myriophyllum verticillat</i>	多年生沉水草本	茎段
15	眼子菜科	眼子菜属	荇草 <i>Potamogeton crispus</i> L.	多年生沉水草本	茎段
			竹叶眼子菜 <i>Potamogeton malaianus</i> Miq	多年生沉水草本	茎段
			鼈齿眼子菜 <i>Potamogeton pectinatus</i> L.	多年生沉水草本	茎段
16	千屈菜科	千屈菜属	小圆叶 <i>Rotala rotundifolia</i> L.	多年生沉水草本	茎尖
17	柳叶菜科	水龙属	叶底红 <i>Ludwigia repens</i> L.	多年生沉水草本	茎尖
		丁香蓼属	大红叶 <i>Ludwigia perennis</i>	多年生沉水草本	茎尖
18	鸢尾科	鸢尾属	杂种鸢尾 <i>Irishybrids</i>	多年生宿根草本	茎段
19	禾本科	菰属	茭白 <i>Zizania caduciflora</i> Hand—Mazz.	多年生水生草本	侧芽
		看麦娘属	看麦娘 <i>Alopecurus aquatilis</i> Sabol.	多年生水生草本	幼穗
		黑麦草属	多花黑麦草 <i>Lolium multiflorum</i> Lam.	多年生沉水草本	幼穗
			黑麦草 <i>Lolium perenne</i> L.	多年生水生草本	种子
		牛鞭草属	扁穗牛鞭草 <i>Hemarthria compressa</i>	多年生水生草本	茎段
		蜈蚣草属	假俭草 <i>Eremochloa ophiuroides</i> (Munro.) Hack.	多年生水生草本	茎段
		苎菜属	香蕉草 <i>Nymphoides aquatica</i>	多年生沉水草本	叶片
21	水鳖科	苦草属	苦草 <i>Vallisneria spiralis</i> L.	多年生浮水草本	叶片
22	雨久花科	凤眼兰属	凤眼莲 <i>Eichhornia crassipes</i> Solms	多年生浮水草本	茎段
23	水蕨科	水蕨属	水蕨 <i>Ceratopteris thalictroides</i> (L.) Brongn	一年生水生草本	茎段

2.4 琼脂

在固体培养时, 琼脂是良好的固化剂。水生观赏植物组织培养时琼脂使用浓度是 0.6%~0.8%。但也有使用 0.5% 浓度的琼脂, 如在小水榕^[9] 和荷花(*Nelumbo nucifera*)^[12] 茎尖的离体培养时; 在宽叶血心兰(*Alseodaphne reineckii*) 的离体培养时使用 1% 的琼脂^[13]; 鹤顶兰则使用 1.4% 的琼脂^[4]。

除了琼脂以外, 还有一些其它的凝固剂。如在金边富贵竹(*Dracaena sanderiana*) 的茎段离体培养时加入 75% 卡拉胶进行固化^[14]; 金椒草(*Cryptocoryne costata*)^[15] 和红蛋^[3] 的茎尖组织培养中均加入 5% 的倍力凝, 它是一种微生物多糖, 也是一种良好的凝固剂。

2.5 植物激素

2.5.1 生长素类 常用的生长素有 IAA、IBA、NAA、NOA、P-CPA、2, 4-D 和 2, 4, 5-T。其中 IBA 和 NAA 广泛用于生根, 在水生观赏植物中尤其以 IBA 使用频率最高^[2-3, 6, 9, 11, 16-17], NOA、P-CPA、2, 4, 5-T 用得比较少。2, 4-D 一般用于细胞启动脱分化阶段。诱导分化阶段使用 NAA 或 IBA、IAA 较好, 如在血叶兰(*Ludisia discolor*) 的组织培养中使用了 0.2 mg·L⁻¹ 的 NAA^[18]; 而在茛草(*Potamogeton crispus* L.) 的组织培养中则添加了 0.5 mg·L⁻¹ 的 IBA^[19]。不同植物和器官在用量上差异很大, 一般用量 IAA 为 0.01~2.0 mg·L⁻¹, IBA 为 0.05~5.0 mg·L⁻¹, NAA 为 0.01~4.0 mg·L⁻¹, 2, 4-D 为 0.1~5.0 mg·L⁻¹。

2.5.2 细胞分裂素类 常用的细胞分裂素有 BAP、6-BA、ZT、Ad、2-ip、KT, 其中在水生观赏植物中以 6-BA 和 KT 使用频率最高, 尤其以 6-BA 最为频繁。如在小对叶^[2]、叶底红^[5]、水芹^[7] 等的组织培养中分别使用了不同浓度的 6-BA。细胞分裂素的一般用量 6-BA 为 0.02~5.0 mg·L⁻¹, KT 为 0.02~4.0 mg·L⁻¹, ZT 为 0.1~3.0 mg·L⁻¹。

2.5.3 赤霉素类 与生长素和细胞分裂素相比, 水生观赏植物组织培养中不常使用赤霉素。例如在荷花的组织培养中添加了 0.2 mg·L⁻¹ 的 GA₃ 效果较好^[12]。赤霉素一般用量在 0.01~3.0 mg·L⁻¹。

2.5.4 激素的种类及配合比例 确定生长素和细胞分裂素的种类及用量需要很长的时间, 对于难获得愈伤组织的一些种类如日本荷根、皇冠属(*Echiodorus*) 等, 需选用特殊的植物生长调节剂。在皇冠草(*Echinodorus orisis* L.) 中, 诱导培养基采用 MS+ZT1.0 mg·L⁻¹+6-BA1.0 mg·L⁻¹, MS+ZT1.0 mg·L⁻¹+6-BA1.0 mg·L⁻¹+NAA0.5 mg·L⁻¹ 或 1.0 mg·L⁻¹, 成熟体胚被转移到含有 IAA

(1.0 mg·L⁻¹) 的 MS 培养基上后, 很快萌发并长成小植株^[20-21]。

细胞分裂素和生长素的比例决定植物形态的发生方向, 比例高时, 诱导芽的发生, 比例低时, 诱导根的形成。在迷你宝塔芽诱导培养基中生长素的量为 NAA0.1 mg·L⁻¹, 细胞分裂素的用量为 6-BA1.0 mg·L⁻¹, 而根诱导培养基细胞分裂素的用量是 6-BA0.1 mg·L⁻¹, 生长素用量 IBA0.1 mg·L⁻¹^[2]。三百草(*Saururus chinensis* L.) 茎段愈伤组织的诱导中, 当 NAA 与 6-BA 之间的相对比例在 (1:2.5)~(1:5) 时, 随着 6-BA 的增加, 茎段愈伤组织的诱导率上升, 当比例在 1:10 以上, 又随着 6-BA 的增加而诱导率下降^[22]。

3 问题及展望

3.1 外植体的表面灭菌

水生植物属于极易污染的植物, 离体培养过程中外植体表面灭菌和尔后内生菌抑制的难度都较其它植物高, 灭菌时间过短, 会全部污染; 灭菌时间过长则全部死亡。这两大技术难点若不加以有效解决, 则很难进行商业化生产。

表面灭菌的第一步是用自来水冲洗, 时间视清洁程度而异。第二步是用洗衣粉水或肥皂水浸洗并搅动约 5 min, 然后用自来水冲净洗衣粉水。第三步是材料的表面灭菌。水生观赏植物外植体大多采用 0.1% 的氯化汞为消毒液, 如水生观赏植物轮叶狐尾藻^[10]、芋(*Colocasia esculenta* L.)^[23]、黄花菜(*Heremacallis fulva* L.)^[24]、大叶青(*Heteranthera zosterifolia*)^[25]、杂种鸢尾(*Iris hybrids*)^[26] 等的组织培养中均采用 0.1% 的氯化汞进行表面消毒, 消毒时间 3~15 min 不等。

其他常用的消毒液还有 84 消毒液^[3]、强氯精^[13]、PPM^[17]、浓硫酸、链霉素^[27] 等。有时可以两种消毒液配合使用, 获得最佳的灭菌效果。如在红蛋的茎尖培养中, 采用 2% 的次氯酸钠和 0.1% 的氯化汞进行表面灭菌, 先用 2% 次氯酸钠消毒 5~8 min, 水洗后再用 0.1% 氯化汞消毒 3 min, 可以达到 100% 的成活率^[3]。

3.2 基础研究薄弱

目前水生观赏植物的组织培养多数局限于培养的最终结果或围绕结果的几个重要因素的研究, 如愈伤组织、脱分化、不定芽或小植株的培养基选用、激素种类与比例、外植株选择等, 而对组织培养过程中的阶段性和各个阶段中环境因子, 如温、光、湿、pH、CO₂/O₂ 等的协同性研究较少, 所以对不同种类水生植物组培的基础研究尤为重要。

3.3 降低生产成本,提高组培成功率

水生观赏植物的组织培养试验结果的可重复性较差,多数报道只有结果,对所采用的技术手段和原因分析较少。为了提高效率,应根据培养目的,研究出相应简化的培养程序和低成本的培养基,提高量化指标的精确度、实验结果的可重复性和应用性,确保研究项目的先进性和成果的真实性。

3.4 利用基因工程技术培育水生观赏植物新品种

许多观赏植物不仅具有很强的观赏性,能通过不同类型水生植物的合理配置,丰富水体的景观层次,创造出美的意境,而且对水体污染还有降解和净化作用。然而,目前水生植物应用仍然存在一些问题。随着城市建设速度的加快,大量污水、废水的排放严重污染了环境和水源,造成水质日益恶化,水资源日益不足,水体的环境容量和生态承载力不堪重负,生态系统遭到极大破坏。水体的结构和功能被破坏,导致生物多样性丧失,景观水体的美学价值遭到严重损害。为此,在当今水资源紧张的背景下,许多专家都纷纷开展相关研究,以求找到合理的治理对策。然而,应用植物基因工程技术,获得转基因植物,已成为近年来环境领域的研究热点之一。近20年来,植物基因工程的发展日新月异,硕果累累。全世界已分离出的目的基因有100多个,其中包括抗污染基因、抗虫基因、抗除草剂基因、抗病毒基因等,获得的转基因植物200多种。因此,可以通过组织培养和转基因技术来提高水生植物的抗污染、抗虫、抗病毒能力等,使水生植物在净化污水、恢复湿地生态系统方面发挥越来越重要的作用。

展望未来,无论是理论研究,还是实际应用,水生观赏植物组织培养的各方面如无性系快速繁殖、无病毒菌的工厂化生产、新品种的创造和培育、突变体的选择和利用、原生质体杂交、基因转移、代谢物质生产、净化水体环境以及建立真正的植物基因库或有价值的基因型的基因文库等研究将会更加广泛和深入。

参考文献:

[1] 沈海龙, 杨玲, 刘关君, 等. 关于植物组织培养课程特色教学的思考与实践[J]. 科学教育论坛, 2006(2): 80-81.

[2] 王丽卿, 季高华, 周胜耀, 等. 4种观赏水草的组织培养试验[J]. 水产科技情报, 2006, 33(2): 84.

[3] 张红梅, 及华, 肖小琴, 等. 红蛋的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(4): 338.

[4] 曹受金, 袁雄强. 鹤顶兰组织培养快繁技术研究[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(5): 890-891.

[5] 孙月芳, 陆瑞菊, 周润梅, 等. 观赏水草的离体培养[J]. 上海农业学报, 2004, 20(2): 17-19.

[6] 莫肖蓉, 蒋琴素. 热带水草绿椒的组培快繁[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(1): 41.

[7] 董玲, 陈静娴, 廖华俊, 等. 水芹组织培养与快繁[J]. 植物生理学通报, 2003, 39(3): 235.

[8] 曹砧声, 蔡汉, 李良俊, 等. 荸荠球茎离体诱导技术的研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(5): 335-336.

[9] 蔡时可, 钟明, 苏海, 等. 小水榕的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(1): 60.

[10] 顾福根, 万志刚, 颜顺意. 轮叶狐尾藻的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006 42(3): 470.

[11] 饶秋容, 张芬, 古志渊. 香蕉草的固体培养和液体培养[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(2): 143.

[12] 刘玫, 陈晔, 孙崇波, 等. 几种珍贵荷花品种组织培养技术研究[J]. 浙江农业科学, 2002(3): 6-9.

[13] 贺蓉, 郑曙明. 宽叶血心兰的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(3): 231-232.

[14] 田朗, 谭海燕, 张霖. 金边富贵竹的茎段培养及试管繁殖[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 133-134.

[15] 张红梅, 及华, 肖小琴, 等. 金椒草的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 37.

[16] 黄伟如, 谢映忠, 梁张慧, 等. 热带观赏水草—红玫瑰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(2): 204.

[17] 高钰, 陈继敏, 杨镇明. 海芋的组织培养与快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(5): 910.

[18] 饶秋容, 张芬, 何伟强. 血叶兰的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(1): 36.

[19] 高健, 杨劭. 沉水植物菹草的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 251-252.

[20] 邢登辉. 皇冠草叶片外植体的体胚发生和植株再生[J]. 植物生理通讯, 1996, (2): 129-130.

[21] Xing D, Zhao Y, Huang C. Somatic embryogenesis of Echinodorus orsis L. and the kinetic changes of the endogenous hormones contents during the embryogenetic process[J]. Chin J Biotechnol, 1999, 15(1): 59-64.

[22] 江年琼, 谢碧霞, 何业华. 三百草的组织培养[J]. 中药材, 2001, 24(12): 8-9.

[23] 刘玉平, 柯卫东, 黄心芳, 等. 芋的组织培养[J]. 植物生理通讯, 1999, 35(5): 378-379.

[24] 张秀珊, 柴向华, 珠饱卿, 等. 黄花菜的组织培养和快速繁殖[J]. 中国农村小康科技, 2006(6): 59.

[25] 高颖. 观赏水草大青叶 *Heteranthera zosterifolia* 的组织培养[J]. 植物生理通讯, 2000, 36(8): 30.

[26] 黄苏珍, 韩玉林, 谢明云, 等. 杂种鸢尾的组织培养和植株再生[J]. 植物生理通讯, 2003 39(6): 638.

[27] 朱红莲, 柯卫东, 汪李平. 慈姑茎尖组织培养与快速繁殖[J]. 中国蔬菜, 2006(3): 15-17.

